

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-34575

(P2002-34575A)

(43) 公開日 平成14年2月5日 (2002.2.5)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ページ(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/21	4 B 0 2 4
1/21		C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
5/10		1/66	4 B 0 6 5
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 N 15/00	Z N A A
1/66		5/00	B
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 12 頁)			
(21) 出願番号	特開2000-228757(P2000-228757)	(71) 出願人	000001959
(22) 出願日	平成12年7月28日 (2000.7.28)	株式会社資生堂	
		東京都中央区銀座7丁目5番4号	
		(72) 発明者	仲西 城太郎
		神奈川県横浜市金沢区福清2-12-1 株	
		式会社資生堂第二リサーチセンター内	
		(72) 発明者	日比野 利彦
		神奈川県横浜市金沢区福清2-12-1 株	
		式会社資生堂第二リサーチセンター内	
		(74) 代理人	100060782
		弁理士 小田島 平吉 (外1名)	
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ヒト I I 型 5 α -レダクターゼのプロモーター遺伝子およびその用途

(57) 【要約】

【課題】 ヒト I I 型 5 α -レダクターゼ遺伝子の発現を調節するための手段の提供。【解決手段】 ヒト I I 型 5 α -レダクターゼ遺伝子のプロモーター遺伝子領域を含む DNA 分子およびその改変体、ならびにこれらを使用する I I 型 5 α -レダクターゼの転写調節物質のスクリーニング方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトに由来するⅠ型5 α -レダクターゼ遺伝子のプロモーターとして作用する単離されたDNA分子であって、(a) 配列番号1で表されるDNA配列からなるポリヌクレオチドにおいて、位置1〜602番目の連続したDNA配列からなるポリヌクレオチド、(b) (a)のポリヌクレオチドのフラグメントであって、位置595〜2番目(T)の転写開始点を含む少なくとも約500の連続したDNA配列からなるフラグメント、ならびに(c) (a)のポリヌクレオチドのDNA配列において、1個または複数個のヌクレオチドが置換、欠失および/または付加することにより改変されており、そして位置595〜2番目(T)の転写開始点を含む少なくとも約500の連続したDNA配列からなるポリヌクレオチドを包含するポリヌクレオチド、からなる群より選ばれるDNA分子。

【請求項2】 請求項1に記載のDNA分子を担持する組換え発現ベクター。

【請求項3】 該DNA分子に操作可能に連結されたレポーター遺伝子をさらに担持する請求項2記載の発現ベクター。

【請求項4】 請求項1に記載のDNA分子または請求項2に記載の発現ベクターを含む大腸菌または哺乳動物細胞。

【請求項5】 該DNA分子に操作可能に連結されたレポーター遺伝子をさらに含む請求項4記載の大腸菌または哺乳動物細胞。

【請求項6】 請求項5に記載の哺乳動物細胞を被検体の存在下で培養し、そして培養物におけるレポーター遺伝子の発現の程度を多寡を被検体のヒトⅠ型5 α -レダクターゼ転写調節能の指標とすることを特徴とする被検体の該転写調節能の評価方法。

【請求項7】 配列番号1で表されるDNA配列中に存在する転写因子結合モチーフに対する転写因子をコードする単離されたDNA分子を含有する発現ベクターを、導入した哺乳動物細胞を培養することによるヒトⅠ型5 α -レダクターゼの発現の亢進または抑制方法。

【請求項8】 請求項7記載の方法を被検体の存在下で行い、該被検体の存在に起因して変化するヒトⅠ型5 α -レダクターゼの発現量の多寡を該被検体のヒトⅠ型5 α -レダクターゼ転写調節能の指標とすることを特徴とする被検体の該転写調節能の評価方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ヒトⅠ型5 α -レダクターゼ遺伝子のプロモーターとして作用することのできる、場合によって適当なレポーター遺伝子が操作可能に連結されていてもよいDNA分子、ならびにその組換え発現ベクターおよび該ベクターを含む大腸菌または哺乳動物細胞に関する。また、本発明は、これらのDNA分

子および細胞の用途にも関する。

【0002】

【従来の技術】 5 α -レダクターゼはテストステロン、4-アンドロステンジオン、プロゲステロンなどの4-エン-3-ケートステロイドの5 α 位還元を触媒する酵素である。その代表的な役割はテストステロンを最も強力な男性ホルモンである5 α -ジヒドロテストステロン(DHT)に代謝することである。DHTは胎生期における前立腺を含む男性外生殖器の分化や思春期における第二次性徴の出現など、特に男性において重要な生理機能を担っているが、前立腺肥大や前立腺癌、あるいは皮膚科領域における男性型脱毛、多毛症、脂漏性皮膚炎、尋常性瘡などの男性ホルモン依存性疾患に関与することも明らかになっている。これらの疾患の予防あるいは治療には、標的細胞におけるDHT産生を抑制することが有効であると考えられ、その手段として種々の5 α -レダクターゼ活性阻害物質の探索が進められている。

【0003】 5 α -レダクターゼにはⅠ型およびⅡ型の2種類のアイソザイムが存在することが明らかにされており、それぞれのcDNAもクローニングされている(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3640-3644, 1990, Nature 354: 159-161, 1991)。

【0004】 成人男性においてⅠ型は皮膚および肝臓において比較的に強い発現を示す一方で、身体各部位においては弱い活性が広く存在している。一方、Ⅰ型は前立腺、副睾丸、精囊などの男性ホルモン標的組織に局在している(J. Clin. Invest. 92: 903-910, 1993)。前立腺の発達には5 α -レダクターゼにより産生されるDHTによりコントロールされているが、前立腺肥大や前立腺癌における5 α -レダクターゼ活性の上昇も報告されている(J. Clin. Endocrinol. Metab. 67: 806-816, 1988)。近年、種々の5 α -レダクターゼ活性阻害剤が開発されてきており、特に、Ⅰ型5 α -レダクターゼの特異的活性阻害剤であるフィナステリド(Finasteride)がこれらの疾患に対して優れた治療効果を示すことが知られている。また、Finasterideは男性型脱毛や多毛症にも治療効果を示す(Biomed & Pharmacother 49: 319-324, 1995)。

【0005】

【発明の構成】 上述のとおり、Ⅰ型5 α -レダクターゼ活性阻害剤は、一定の男性ホルモン依存性疾患に有効であり、それらの一部は、5 α -レダクターゼに対する阻害活性を評価することにより開発されたものもある。しかし、5 α -レダクターゼ活性阻害剤とは異なる作用点をもつ多様な薬物を提供することも望まれるであろう。

【0006】 本発明者らは、かような要望に応えるため、Ⅰ型5 α -レダクターゼそのものの生体内での産生を調節する評価系を確立すべく検討してきた。その結果、本発明者らは、ヒトⅠ型5 α -レダクターゼ遺

伝子の転写開始点については明らかにされているものの (Endocrinology 131: 1571-1573, 1992)、今まだ、該転写開始点を包含する領域については十分な解析がなされていない、特定領域のポリヌクレオチドおよびその一定の改変体が該 α -レグクターゼ遺伝子の転写調節に強く関与することを見出した。

【0007】本発明は、このような知見に基づいて完成されたものである。

【0008】したがって、本発明の1の態様は、ヒトに由来する I I 型 α -レグクターゼ遺伝子のプロモーターとして作用しうる単離されたDNA分子であって、

(a) 配列番号1で表されるDNA配列からなるポリヌクレオチドにおいて、位置1〜6022番目の連続したDNA配列からなるポリヌクレオチド、(b) (a)のポリヌクレオチドのフラグメントであって、位置5952番目(T)の転写開始点を含む少なくとも約50の連続したDNA配列からなるフラグメント、ならびに

(c) (a)のポリヌクレオチドのDNA配列において、1個または複数個のヌクレオチドが置換、欠失および/または付加することにより改変されており、そして位置5952番目(T)の転写開始点を含む少なくとも約50の連続したDNA配列からなるポリヌクレオチドを包含するポリヌクレオチド、からなる群より選ばれるDNA分子に関する。

【0009】また本発明は、このようなDNA分子の用途にも関し、該DNA分子を担持する組織発現ベクター、ならびに該DNA分子または該組織発現ベクターを含む大腸菌または哺乳動物細胞に関する。なお、該DNA分子は、操作可能に連結されたレポーター遺伝子をさらに含んでもよい。このような、レポーター遺伝子を含む場合の哺乳動物細胞を使用して各種被検体のヒト I I 型 α -レグクターゼ転写調節能を評価しうる系を提供できる。各種被検体としては、天然有機化合物、化学合成化合物をはじめとするあらゆる化合物が包含される。かような評価系は例えば、ヒト I I 型 α -レグクターゼ転写調節能を有する薬物のスクリーニング法に適用することもできる。

【0010】こうして本発明によれば、ヒト I I 型 α -レグクターゼ遺伝子の発現調節機構を解明するのに役立つ手段とともに、該発現いかに関連する疾患の診断および予防・治療にも役立つばかりでなく、種々の細胞に対して優れた I I 型 α -レグクターゼの産生能亢進(または上記転写の不活性化)あるいは抑制作用(または上記転写の不活性化)を示す薬剤のスクリーニングなどに利用できる可能性もある。

【0011】

【発明の好適な形態】本明細書で使用するところの「プロモーター」の語は、転写開始反応の効率に関与するDNA領域の意味する。したがって、「プロモーターとして作用しうる」とは、転写調節能を有すると互換可

能に使用されており、究極的には、ヒト I I 型 α -レグクターゼの発現を正または負に調節する。転写活性化作用および転写不活性化作用を有することを意味する。本発明では、限定されるものでないが、転写不活性化作用により重点が置かれている。

【0012】まず、本明細書で使用するところの「操作可能に連結された」とは、プロモーターまたは転写調節領域(もしくは転写調節能を有する領域)に連結された目的とするポリヌクレオチド(例えば、レポーター遺伝子)が一定の宿主細胞内で発現しうるような形態で連結されていることを意味する。一般に、ポリヌクレオチドは転写調節領域の下流に連結され、この連結に際しては、転写調節領域と目的とするポリヌクレオチドとの間に該ポリヌクレオチドの発現に悪影響を及ぼさないポリ(もしくはオリゴ)ヌクレオチドが介在してよい。

【0013】本発明に従う単離されたDNA分子は、配列番号1で表されるDNA配列からなるポリヌクレオチドにおいて、位置1〜6022番目の連続したDNA配列からなるポリヌクレオチドである。このようなポリヌクレオチドは、例えば、まず、配列番号2および3で表されるプライマーおよびヒトゲノムDNAを用いたそれ自体公知のPCR法によりヒト I I 型 α -レグクターゼ転写開始点に近い領域のDNAフラグメントを取得し、これをジギキゲン標識したものをプローブとしてヒトゲノムDNAライブラリーのスクリーニングを行なう。次いで、陰性ブランクよりファージDNAを調製し、これを適当な制限酵素で消化し、上記プローブを用いたサザンブロットニングにより目的DNAフラグメントを同定する。このDNAフラグメントをp Bluescript I I ベクターにサブクローニングすることにより調製できる。

【0014】また、本発明に従う、別の単離されたDNA分子は、上記ポリヌクレオチドのフラグメントであって、配列番号1の配列中の位置5952番目(T)の転写開始点を含む少なくとも約50の連続したDNA配列からなるフラグメントを挙げることができる。これらのフラグメントは、さらに、ヒトに由来する I I 型 α -レグクターゼ遺伝子のプロモーターとして作用しうるものであらねばならない。これらのフラグメントは、上記要件を満たすものであられいづれのDNA分子であってもよく、また、それらの調製は、後述する実施例2に記載の方法に従って、上記転写開始点が残存するように適当な制限酵素を使用して、配列表1で表されるDNA配列からなるポリヌクレオチドを消化して取得することができる。

【0015】さらなる本発明に従う、単離されたDNA分子として、上記位置1〜6022番目の連続したDNA配列からなるポリヌクレオチドの基準となるDNA配列において、1個または複数個のヌクレオチドが置換、欠失および/または付加することにより改変されてお

り、そして位置5'952番目(T)の転写開始点を含む少なくとも約50の連続したDNA配列からなるポリヌクレオチドを包含するポリヌクレオチドを挙げることができる。また、これらのポリヌクレオチドも、ヒトに由来するI型5 α -レグクター γ 遺伝子のプロモーターとして作用しうるものであらねばならない。さらに、欠失することにより改変されたポリヌクレオチドとしては、上記のフラグメントと重複するものが除外できるように、基準となるDNA配列が中断されるように、好ましくは1個または数個のヌクレオチドが欠失されている配列からなるポリヌクレオチドを挙げる事ができる。欠失する箇所は、上記の要件、すなわち転写開始点が残存し、かつ、プロモーターとして作用しうるものであれば、その場所および数を問わないが、通常、後述する複数存在する転写因子結合モチーフの1個または2個以上がそれらの機能を失う(すなわち、対応する転写因子が結合できなくなる)ような位置であることが好ましい。

【0016】他方、置換は、上記要件を満たすものであれば、基準となるDNA配列中の1箇所または2箇所以上上の塩基(A、T、C、G)がいつれか他の塩基で置換されていてもよく、また、これらの置換は2個以上の連続する塩基の置換であってよい。これらの置換も、上記転写因子結合モチーフの1部が機能を失うように起こすことができる。さらに、付加は、5'末端もしくは3'末端へのヌクレオチドまたはポリもしくはオリゴヌクレオチドの付加、ならびに基準となるDNA配列の途中に上記ヌクレオチド等が割り込むように付加されている場合を包含する。勿論のこと、上記要件を満たすことも求められる。

【0017】これらの置換、欠失および付加は、それらの2種以上が同時に起こっていてもよく、制限酵素による消化とリガーゼによる連結、部位特異的変異の導入、PCR等のそれら自体周知の技術によりもたらすことができる。

【0018】以上の単離されたDNA分子は、さらに操作可能に連結されたレポーター遺伝子を含んでもよい。通常は、DNA分子の下流にフレームを合わせた状態でレポーター遺伝子が、場合によって該遺伝子の発現に影響を及ぼさないポリヌクレオチド配列を介して、連結される。レポーター遺伝子は、当該技術分野で公知のいずれであってもよいが、それらの発現を容易に検出できるものが好ましく、限定されるものでないが、ルシフェラーゼ遺伝子や β -ガラクトシダーゼ遺伝子を挙げることができる。上記連結方法もそれ自体公知の方法を利用できる。

【0019】本発明に従えば、上記DNA分子または該DNA分子が操作可能に連結されたレポーター遺伝子を含む構造物を担持するベクター、好ましくは発現ベクターも提供される。このようなベクターの1種類はプラスミドであり、別の種類のベクターはウイルス由来のベク

ターであることができる。これらのベクターは、導入された宿主細胞内で自律複製である。本明細書では、このようなベクターを発現ベクターまたは組換え発現ベクターと称している。

【0020】このような発現ベクターの構築に使用できるベクターとしては、その後トランスフェクションすべき宿主細胞に応じて、多種多様のベクターを使用できるが、本発明の目的上、大腸菌を宿主として利用できる場合には、例えばpBluescript II (ストラタジーン社製)が、そして哺乳動物細胞を宿主として利用する場合には、例えばpGL3 basicベクター(プロメガ社製品)を都合よく使用することができる。かような発現ベクターの構築もそれ自体周知の方法に準じて行うことができる。

【0021】本発明に従えば、さらに、上記発現ベクターもしくは組換え発現ベクター、または上述のレポーター遺伝子が操作可能に連結されていてもよいDNA分子を含む大腸菌または哺乳動物細胞も提供される。発現ベクターやDNA分子からなる外来のDNA分子の宿主細胞(大腸菌または哺乳動物細胞)への導入またはトランスフェクションもまた、それ自体公知の方法にしたがって行うことができる。これらの方法には、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、DEAE-セキストラン-媒介トランスフェクション、リポフェクションまたは電気穿孔法を挙げることができる。宿主細胞の適当な形質転換またはトランスフェクション法は、Sambrookら、(モレキュラークロニング: アラボラトリマニヤル、第2版、コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバーラボラトリー出版、コールドスプリングハーバー、NY、1989)および他のラボラトリマニヤルに見いだすことができる。

【0022】上記外来のDNA分子が導入された大腸菌(例えばJM109株)は、該DNA分子を増幅するのに役立つ一方で、哺乳動物細胞は、後述するように、被検体のヒトI型5 α -レグクター γ 転写調節能の評価方法に役立てることができる。このような目的を達成するために使用できる哺乳動物細胞としては、ヒト前立腺ストローマ細胞、ヒト包皮線維芽細胞、ヒト毛乳頭細胞などを挙げることができる。

【0023】上記評価方法は、上記のDNA分子(特に、レポーター遺伝子を含む)が導入された哺乳動物細胞を、被検体の存在下で培養し、そして培養物におけるレポーター遺伝子の発現の程度が多寡を被検体のヒトI型5 α -レグクター γ 転写調節能の指標とすることによって行うことができる。レポーター遺伝子の発現の程度は、使用するレポーター遺伝子に応じた適当な検出手段で発現産物のレベルを測定し、そして、その発現の程度が多寡は、例えば、被検体が存在しないことを察して、その他は同一の培養条件で培養を行って得られる培養物(対照)におけるレポーター遺伝子の発現の程度と

比較することによって決定することができる。培養も、使用する宿主細胞の種類に応じて、当該技術分野で公知の条件下で行うことができる。

【0024】なお、上記の評価方法は、ハイスループットスクリーニング (high throughput screening, Nature, 384, supp. 14-16, 1996) のような化合物ライブラリー、天然物からの I 型 5 α -レダクターゼ転写調節物質スクリーニング法に向けることができる。

この細胞を化合物で適当な時間処理し、レポーター活性を測定し、活性を上昇もしくは下降させる物質をスクリーニングする。こうして得られる物質は、例えばシスエレメントあるいは転写因子に作用して直接もしくはシグナル伝達系の制御により間接的にヒト I 型 5 α -レダクターゼの発現を調節することができるであろう。

【0025】さらに、配列番号 1 に表される DNA 配列について、例えば TRANSFAC 等のデータベースを基に転写因子結合モチーフの検索を行なうことにより、I 型 5 α -レダクターゼの転写制御に関与する転写因子を予測することができる。実際に配列番号 1 に表される全 DNA 配列について検索を行なったところ、SP-1、AP-1、CREBP1、Nkx-2.5、SOX5 などをはじめとする多数の転写因子結合モチーフの存在を認めた。これらの転写因子は I 型 5 α -レダクターゼ転写制御領域中のシスエレメントに作用して I 型 5 α -レダクターゼの転写を亢進または抑制するものと考えられる。したがって、これらの転写因子の産生を制御する物質、あるいは転写因子のシスエレメントへの結合を阻害する物質も I 型 5 α -レダクターゼ転写制御物質として有用であろう。

【0026】実際に、これらの転写因子が I 型 5 α -レダクターゼの発現を制御している例として、SRY (Sex determining region Y) による I 型 5 α -レダクターゼの発現亢進を挙げることができる。具体的な結果を実施例 5 に示す。したがって、SRY の産生阻害あるいは SRY とシスエレメントとの結合阻害を作用点とする物質は I 型 5 α -レダクターゼ転写抑制物質として有用であろう。

【0027】したがって、本発明によれば、配列番号 1 に表される DNA 配列中に存在する転写因子結合モチーフに対する転写因子をコードする単離された DNA 分子を含有する発現ベクターを、導入した哺乳動物細胞を培養することによりヒト I 型 5 α -レダクターゼの発現の亢進および抑制方法ならびに該方法を被検体の存在下で行い、該被検体の存在に起因して変化するヒト I 型 5 α -レダクターゼの発現量の多寡を該被検体のヒト I 型 5 α -レダクターゼ転写調節能の指標とすることを特徴とする被検体の該転写調節能の評価方法も提供される。この評価方法もまた、I 型 5 α -レダクターゼの転写調節物質のスクリーニング方法に向けることもできる。上記評価方法で転写因子結合モチーフに対する転

写因子をコードする DNA 分子を含有する発現ベクターが導入される哺乳動物細胞としては、外来の DNA 分子として操作可能なレポーター遺伝子が連結した前記 DNA 分子を含んでいてもよい、ヒト前立腺線癌細胞、ヒト包皮線維芽細胞、ヒト毛乳頭細胞などを挙げることができる。

【0028】本発明のスクリーニング方法で得られる I 型 5 α -レダクターゼ転写抑制物質は、前立腺肥大や前立腺癌、あるいは男性型脱毛症などの男性ホルモン依存性疾患の予防および治療に有効であろう。

【0029】

【実施例】次に実施例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明の範囲はこれによって限定されるものではない。

実施例 1: ヒト I 型 5 α -レダクターゼゲノム DNA のクローニング

配列番号 2 および 3 で示されるプライマーおよびヒト胎盤ゲノム DNA を用いた PCR 法により、配列番号 4 に示すヒト I 型 5 α -レダクターゼ転写開始点に近い領域の DNA フラグメントの取得した。これをジギキシン標識したものをプローブとしてヒトゲノム DNA ライブラリーのスクリーニングを行なった。具体的にはクローンテック社製ヒトゲノム DNA ライブラリー (ベクター: EMBL3 SP6/T7) を大腸菌 K802 株に感染させた後、プラークを形成させ、これをナイロンメンブランに転写し、上記プローブを用いたハイブリダイゼーションを行なった。検出にはアルカリフォスファターゼ標識抗ジギキシン抗体 (ロシュ・ダイアグノスティクス社製) を用いた発色反応をおこなった。約 200 万個のプラークをスクリーニングした結果、#1 および #2 の 2 個の陽性プラークを取得した。これらよりファージ DNA を調製し、これを種々の制限酵素で消化した後、上記プローブを用いたザンブプロットングを行なった結果、複数の DNA 断片が陽性を示した。このうち #1 のファージ DNA を BamHI で消化することにより得られた約 8 kb の DNA 断片が、ヒト I 型 5 α -レダクターゼ遺伝子の既知塩基配列および制限酵素マップにより、転写開始点を含む 5' 上流域を最も長くカバーしていることが確認されたので、以後の実験にはこの DNA 断片を用いた。この DNA 断片を EcoRI 消化して得られた約 6.2 kb の断片を同様に BamHI および EcoRI で消化した pBluescript II ベクターにサブクローニングした。このプラスミドを p6.2BS と命名した。約 6.2 kb の挿入断片の全塩基配列を配列番号 1 に、さらにその構造を図 1 示した。

実施例 2: ヒト I 型 5 α -レダクターゼプロモーターとルシフェラーゼレポーター遺伝子を連結させたレポータープラスミドの構築

配列番号 1 に示す DNA 断片はヒト I 型 5 α -レダ

ターゼ遺伝子の5' 上流領域に加え、翻訳開始コドン (ATG) 以降の構造遺伝子の一部 (配列番号1に示される6023番から6224番) も含んでいるため、このままルシフェラーゼ遺伝子を連結したのではフレームシフトによりルシフェラーゼの発現が期待できない。そこで、p6、2BSプラスミドよりII型5 α -レダクターゼの構造遺伝子部分を除く操作を以下の通り行なった。まず、p6、2BSプラスミドをSacIIで消化することにより、配列番号1に示される5823番のSacIIサイトからpBluescript II由来のSacIIサイトまでを除いた。一方、5' 末端にSacII認識配列をつけた配列番号5および配列番号6に示されるPCRプライマーを用いてp6、2BSプラスミドを鋳型としてPCR反応を行ない、配列番号1に示される5820番の塩基「C」(SacIIサイトの3塩基前) から翻訳開始点直前の6022番の塩基「G」までのDNA断片を得た。この断片をSacIIで消化した後、上記の通りSacIIで消化したp6、2BSプラスミドにライゲーションした。挿入断片の方向を確認し、配列番号1と同じクローンを選んだ。このプラスミドをp6、0BSと命名した。次に、p6、0BSプラスミドをBssHIIで消化して得られた約6 kbのヒトII型5 α -レダクターゼ転写調節領域のDNA断片を、KpnIおよびHindIIIで消化したpGL3 basicベクターにサブクローニングした。こうして得られたプラスミドをpRedII-Lucと命名した。さらに、pRedII-Lucを制限酵素消化することにより、挿入されているII型5 α -レダクターゼ転写調節領域DNA中の切断点より5' 側を除いた後、セルフライゲーションさせたpRedII-Lucの変異体を作製した。実際に作製した変異体プラスミドの名称と作製のために用いた制限酵素を表1に示す。

【0030】

【表1】

表 1

プラスミド名	制限酵素
pRedII/ApaI-Luc	ApaI
pRedII/SnaBI-Luc	SnaBI, XhoI
pRedII/PstI-Luc	PstI, XhoI
pRedII/BalI-Luc	BalI, XhoI
pRedII/NsiI-Luc	NsiI, XhoI
pRedII/BstXI-Luc	BstXI, XhoI
pRedII/HindIII-Luc	HindIII, XhoI
pRedII/PFIMI-Luc	PFIMI, XhoI
pRedII/KpnI-Luc	KpnI
pRedII/Eco065I-Luc	Eco065I, XhoI
pRedII/StuI-Luc	StuI, XhoI

【0031】実施例3: ヒトII型5 α -レダクターゼプロモーター活性の測定

この実施例では、ヒト培養毛乳頭細胞にトランスフェクションした上記の各レポータープラスミドのプロモーター活性を測定した。

【0032】まず、トランスフェクション前日に細胞数を一定にして24穴プレートに播種した。翌日、各プラスミドおよび遺伝子の導入効率測定用の内部コントロールとしての β -ガラクトシターゼ遺伝子を含んだpSV- β -Galactosidase Contorol Vector (プロメガ社製) をリポフェクトアミンプラス試薬 (ライフテックオリエンタル社製) と混合し、細胞に添加し、遺伝子導入した。24~48時間培養した後、細胞を溶解しルシフェラーゼ活性および β -ガラクトシターゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性はビクザン発光キット (東洋インキ製) を用いて、 β -ガラクトシターゼ活性は発色基質であるCPRGを用いて測定した。その結果を表2に示す。プロモーター活性は、ルシフェラーゼ活性を β -ガラクトシターゼ活性で補正し、さらにpRedII-Lucのプロモーター活性に対する相対値としてあらわした。なお、転写開始点を含め約600bp付近までのDNAフラグメントも、強いプロモーター活性を有することが確認されている。

【0033】

【表2】

表 2

プラスミド名	転写開始から転写調節領域までのサイズ (bp)	プロモーター活性
pRedII-Luc	5852	100
pRedII/ApaI-Luc	4763	587
pRedII/SnaBI-Luc	3553	293
pRedII/PstI-Luc	2949	1380
pRedII/SalI-Luc	2370	1512
pRedII/NsiI-Luc	2093	1586
pRedII/BstXI-Luc	1783	1385
pRedII/NciII-Luc	1576	1652
pRedII/PF11-Luc	837	1943
pRedII/ApaI-Luc	570	2362
pRedII/Eco65I-Luc	346	2768
pRedII/StuI-Luc	149	2822
pGL3 basic	-	0

【0034】実施例4：I型5 α -レダクターゼ転写制御物質のスクリーニング

実施例3と同様に、毛乳頭細胞にpRedII-LucおよびpSV- β -Galactosidase Control Vectorをトランスフェクションする。24時間後に種々の物質を添加しさらに24~48時間培養する。その後、実施例3と同様の方法でプロモーター活性を測定する。このようにしてI型5 α -レダクターゼ発現を亢進もしくは抑制させる種々の物質をスクリーニングすることができる。

実施例5：転写因子SRY (Sex determining region Y) によるI型5 α -レダクターゼの転写亢進

I型5 α -レダクターゼ転写調節領域DNAの塩基配列についてTRANSFACデータベースを基に転写因子結合モチーフの検索を行なった結果、転写因子SRYの結合モチーフを認め、SRYによるI型5 α -レダクターゼの転写調節の可能性が示唆された。そこでSRYの過剰発現によるI型5 α -レダクターゼの発現変動を毛乳頭細胞を用いて検討した。具体的には、まず5'末端にEcoRI認識配列をつけた配列番号7および配列番号8に示されるPCRプライマーを用いてヒトゲノムDNAを鋳型としてSRY構造遺伝子全長を取得した。この断片をEcoRIで消化した後、同様にEcoRIで消化した発現ベクターpVP22/myc-His (インビトロジェン社製) にサブクローニングし

た。このプラスミドをpVP22-SRY/myc-Hisと命名した。pVP22-SRY/myc-HisおよびネガティブコントロールとしてpVP22/myc-Hisを実施例3と同様の方法でそれぞれ培養毛乳頭細胞にトランスフェクションした。48時間培養した後、細胞を回収しRNAを抽出し、RT-PCR法によりSRYおよびI型5 α -レダクターゼのmRNA発現を検討した。その結果を図2に示す。pVP22-SRY/myc-Hisの導入によりSRYは約10倍に、I型5 α -レダクターゼは約4倍に発現量が増大した。この結果より、SRYはI型5 α -レダクターゼの発現を亢進させることが明らかになった。

【0035】

【発明の効果】本発明によれば、ヒトI型5 α -レダクターゼのプロモーターを「含んだ」上流遺伝子と適切なレポーター遺伝子を連結させた組換え発現ベクターを導入した動物細胞を用い、レポーター活性を指標にしてヒトI型5 α -レダクターゼの発現を正または負に制御する物質をスクリーニングすることができる。特に、I型5 α -レダクターゼ遺伝子の発現を抑制する物質は、前立腺肥大や前立腺癌、あるいは男性型脱毛症などの男性ホルモン依存性疾患の予防および治療に効能を有するであろう。

【0036】

【配列表】

SEQUENCE LIST

<110> Shiseido Co., Ltd.

<120> ヒトI型5 α -レダクターゼのプロモーター遺伝子およびその用途

<130> 200007102

<160> 8

<210> 1

<211> 6224

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gaattctctg tctgaatggt cctatgtctt gttcttcag gatgtgtcca tgggtgctta 60
cttagtctat ttggtgaagt catgttttcc tggatlatct tgatacttgt aaatgtcttt 120
tgggtgttag atttattgta gtcttcactg tctgtgtttt ttgttctctg tctctcttgg 180
gatggatttt cagatatttg aaaaagaccg agtatittga tctatgtctg atctgcttta 240
gagsgtacca caatccagat aatgctatgg ttcttgagtt tctctagatg actgcttllg 300
tgtctcttga caagatcag galaattctc tggattarca ggcagatact cttattttct 360
ttccttacit tctcccaaac agagtccctc tgcagttctt gagaaccttg aagctaggag 420
tggagtgaag ccagaccctc ggaagacacc accactatga ctgtgtctag ccagacttga 480
aaccagcaca acactggctc ttccctgtgt taaccactcc ctggccactg cctatgtttg 540
ctcaaggcct tggsgctcta caataaacag gtggaaaagc catccagctg tgtgccttcc 600
cttcagggtt ggcaagtctc cccaagcccc aggtgggtcc agagatgttg tctaggagtc 660
aggactaga gtaaaaacac tttagactct acctggcatt ctatgttatt aaatttgagc 720
tgsggggagc tggsgggaaa gtgtggaggg ggagtggggg ataaaagact acacattggg 780
tacgggtcac accgttggg tgatgggac caaaalctca gaatatcaca ctgaagactt 840
atctgtgtaa ccaaacacca cctgttcccc aaaaacctat tgaataataa ataataataa 900
ataataataa aatgaataaa caaaaacct gagctggcac tcaaacacca aaacacagtc 960
tttccactc ttctctcccc tgctcaaggc cagagagacc tcaactccaca gccacaaaga 1020
agtactgtgt gattataact ggtatctatt taaggcagaa aggtatttaa gtcagctggt 1080
ggtactgctt gcttgcctg ggaactcact ttgtggcgag tggsgtcccc tgttgccca 1140
ggaaaggtct agaatgtgt ttgaagagtc aactcttga atcaagggac cccaagagct 1200
tgccttgctg tttaactccc tgtgtgctag ccagtacctg aaaccagcta gctcagagg 1260
ctcaccagag gcccttgatg tagtatctgg glatactgct tgggtattca gagcacaagg 1320
gcttttcagc tagcagtgga tgaacgtctc catgctggg tctttccctt caaagcagtg 1380
ggttcccttc tggcccaagg ttgttctagg aatgtcaact ggaagctagg gcttggaaac 1440
ggacactcat tatttgaact ggtgcataat ctgtgtgccc tgagcttgta tccaagatgc 1500
aaggcagagt ctctcaact ctttctcttc ctcttctcaa gcagcaggaa gggctctctt 1560
ttagagttgt gagttgtgca gcttgggatt ggggaggggt gatgcagca ctccttggc 1620
tgccccagct ggggtgtctca gtalatittg caccctcag tccactgtct ctgcccctag 1680
ttcagttacta ggaattgtct aagaattgca gttcttttgg cctaaactgc ctttcaggtt 1740
tagtcagaga tccagagcac ttacgcccct agtggtaggg ttgttgggaa ctgaaatctt 1800
gactgtcgga attagtaatt cccctttggc tggagctggt ttgaatgtct cctttatgtg 1860
gggtcagcag ctgaactttg tctgcttttc ctttttctg taacaggaca acactgagtt 1920
taatgcttca ccatlgtgtt gttctccctc acccagtga cgaataatgt ctttgacca 1980
caccacagct gccagggtgt gatgaggggg tgccttcagt gcttcaagac tcttcttga 2040
acctttttag tgccttttcc agcaacacaa agttaaaagc aggtactgca agtgcact 2100
tgagttttgg ttcttgtgaa ggaactttgc ttgcacagat agttgtttaa ttggtgtctt 2160
tgttggggaa acaatcagtg gacgttctta ttccaccatc ttgtctccac tcccatagta 2220
ctatacatct ctcttttttg ctatgttgtt ttggaatttt ttgctataat aaactgtag 2280
ttgtagatat agtgccttcc agagttcttt aatttttttt agtgaattat caagcttgaa 2340
gggttagtgg ggaattctaa atatgttagc cagctgttla gaagtatagg tagcttactt 2400
aaacttgac ttgcagctga tctctgaagt aagacagtg ttatgggaga ccatgtcctt 2460
aacttttga gtttggctca actctagtag ttgtgttcaa aagttgagt aacatgctta 2520
glaattttag gaatcgga taattgtaag gctataatct tactgtctgt gatitlaattg 2580
acttcttita aacagtgctg gactgttita ggttacttgt gactacactt gatcctttgg 2640
ggagattgat ttatgttttt gttaaagaa tagcttttat tctactaat tccaactact 2700
tgtatgcat ttctactact aaacctaggg ctcttggat ctccacgata gctgttctct 2760
ggagattata aatgactcta acacattttt catatgcaa ccaactaat cagggtcact 2820
aggttcccca accatttct ttatcgagc tctacacctt ggcacactat tctctgcc 2880

```


taatcagcca ggtcaggta acagaaaagt aaagacagcc gctgtacccc agagcctgct 2940
 aaaagtattc aaacagccta atcctaagcc tgaattacct gtacgccca ctcttctctg 3000
 cgaagaactc agtaaaagct ctgcgccacc ttgacccttc actccgctgt cctcctaaca 3060
 ctgtgctctc tccatgtggg ctltgggtggt gtgctgtgtc ttctgtttgt agggatctgt 3120
 cgtataaaac ctlttctctc acagatgta ttctgtgtc tgcatagtt accacattga 3180
 ttaaaaagag taagtactgt atgaticcac ttaccggaaa tccaaaagca gacaaaatta 3240
 acttatgttg ttagaagtca gsgtagtggt gttttttttt ttgtcttttt tttttttttt 3300
 ttttttcttg gaaggagat gtaaggagge agggagcagc atcctgatat gctgataatc 3360
 tttatcttga cctagtgca gcttgcaaga gsgtltttag ttgtgtcaaa tcaaccaagc 3420
 tgtatattta taattgggca ctlttctctt gcatgtaata cagaccagtt gcattattgg 3480
 ttccaatttt ctacctccca ctataacct gccctttacc atgtaacttt acaaatagtc 3540
 tctcactttg gctctagaat ccacatatg acttgatttg gccaatcaa taataggaa 3600
 gtaagggtgt gctgttctt gacctgagcc tgaagagccc ttgtgtgttt ctctactct 3660
 cgtacttttg ttattaaat tatatagaca tsgtggagct agctcaacta tccaggatg 3720
 agagctcag ctaagtittt cccccaacac acagcctgga gctgggctct aactgttac 3780
 acagatgaat gagtgaatat tgttaagata agtcaagccc agcccagatt tctgacctac 3840
 agccaacca cagatgata agctgaagat gactggtttt atcaagctaa ttgttataat 3900
 attggagaaa agatcatgag gacaaaagt gggcagagtc ggaagaaaaa agaggaagaa 3960
 attgagacag aagacatttc atttaaaaa aatatccat tgagctgggt ttgaatatgt 4020
 gcactgcttg ttctctaat gctgtatggt gtcatgaaat ctattgttta ctgagtctat 4080
 gaggcagctt cctaggagag ctatggcaat ttaggagcag gaagaggtta cactcaggaa 4140
 catagaggga gaatttgggt ccaagtgggt ggggggaaaa ataactgggt ttagttttgg 4200
 gtggggtctg ttttgagtc tctgaagac atgtaagtgg agttttccag caggagagaa 4260
 acgagagctc aaagctcata tctttgctgg caatctagat ttgggcatct tcaacagca 4320
 ggtgtagctc gaggaaagct ggaatgact tgtactctaa agccatgca aaaaaagctt 4380
 gaaacggcta tgaatggtaa gacttgctt tccatgaaa aatgcttcgg tcatgatgag 4440
 tgaatccaaa gtgtgatca attaaaaact gaagtatgat tagcataaat tataaccaca 4500
 tgggaatatg ataaacgact ctltgtcagc aagcagagg tgccttgtag tgcataagca 4560
 tccacatata ccatgtgtgc caagaatcag gagacacccc aaacggagac agatgagggg 4620
 ttgtgtctgt catlgacca gctgacctga tccagcagaa gttaggtggag atacactgaa 4680
 tgggctctct gggagcgtg agttgaaggg gaagggaagag aagagacctc caagtlaagg 4740
 gaagagttaa aatgagaag gactgggttg gagccccaag tagggaccag agggagaaac 4800
 agggataaag taatcaaggg agatgggaca ggaagtgaaa agaatgaggt aaacagcagg 4860
 tgggaagagg aggtcaacct aaagagaaga gccgggttga agaaaagaag agagagaaga 4920
 aagaagggtt gggaacaga ggaaggagca gccagaagaa ccttgaaact gaatcataga 4980
 acggaagagg tagaagacgg agggcctgga ggatacata aagtgaggaa acggaagaga 5040
 gaagaacccg cgtctcgtg tatcagggct agacaggagt tcaagaagaa gccgggtcgc 5100
 caggccacca cctgatgggc caggctcat tggctctagg agctgggaaa gggcatccca 5160
 ggaagaagcg cctagacttt agcctgagtc tgggcaactc tagggagcgg ggaagtgggt 5220
 ggcggagagag gacgagaga atctcgactt ctggcccaaa tctgtgcatg atcaaccgag 5280
 ctacaggac gctctctctc gaccaggca ggggctcag ggaagctgc gggatgcag 5340
 agagaaaccc cttagaattt agggccggga gaaacttgta cctgcggggg cgtgtggtg 5400
 gggcagagct ggcactgat ctgagagctg ctaaggagcg gcgcgcccca gagcagaagg 5460
 gctggcagac gctcagagag ccagatggt tcagggtcca aggaaggtcc tatgttgggt 5520
 ggaagcttg agaggaatga agtctagag gaaccggag agatgaaag accttggtt 5580
 gsgtcttga ggttggaact gcttggtgac cgacggcaca gagggtgtt gttgggggg 5640
 aagaaccacc ccagctgaat cgtcccgctg gsgtcttctt cccgtgtctt agtccagaa 5700
 gttgcccatc cagacgtaa tagttagaga acaagctatg gaaggagacg ctacggcgga 5760
 gctgaatgta aagcgtgga gaggcgggc gaactaagaa ggccttggtt ctctccggc 5820
 caccgggctc gcatcttga gaaagggtta ttgtgcgaa gccgcgcag gctggagcg 5880

```

ggcagggtgg gaggcaggat ggaaggccgg gaggcaaggc cgaagggggc gacacgggtg 5940
ggtctggcgc ctccataaag cggttgcggg ggcgcgcctc tctctggga ggcagcggc 6000
caccggcgag gaacacggcg cg atg cag gtt cag tgc cag cag agc cca gtg 6052
Met Gln Val Gln Cys Gln Gln Ser Pro Val
1 5 10
ctg gca ggc agc gcc act ttg gtc gcc ctt ggg gca gcc gcc ttg tac 6100
Leu Ala Gly Ser Ala Thr Leu Val Ala Leu Gly Ala Leu Ala Leu Tyr
15 20 25
gtc ggc aag ccc tcc ggc tac ggg aag cac acg gag agc ctg aag ccg 6148
Val Ala Lys Pro Ser Gly Tyr Gly Lys His Thr Glu Ser Leu Lys Pro
30 35 40
ggc gct acc cgc ctg cca gcc cgc gcc gcc tgg ttc ctg cag gag ctg 6196
Ala Ala Thr Arg Leu Pro Ala Arg Ala Ala Trp Phe Leu Gln Glu Leu
45 50 55
cct tcc ttc ggc gtc ccc ggc ggg atc c 6224
Pro Ser Phe Ala Val Pro Ala Gly Ile
60 65

```

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒト I I 型 α -レダクターゼの転写開始点付近の配列を参考にして合成

<400> 2

gaaaccgtg aggaattagg gccggagag actggtacct gccggggcg tgtgtgggg 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒト I I 型 α -レダクターゼの転写開始点付近の配列を参考にして合成

<400> 3

ttcgaccaa tacccttct 20

<210> 4

<211> 517

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gaaaccgtg aggaattagg gccggagag actggtacct gccggggcg tgtgtgggg 60

cagagctggc actgatctgt agagtggcta aggagcggc cgcccaagag cagaaggct 120

ggcagcgcct cagagagcca ggaatgttca ggttcaagg aaggtcctat gttgggtggg 180

agctgtgggg gattgaaagt gcatgaggaa ccgagagaga tgaagaacc ttgctctggg 240

tgtttgaggg tggactgag tggtagacca cggcacagag ggtgtgtgt gggggggaag 300

aaccaccca gctgaatcgt cccgtgggg tttttccc gtgtcttagt tccagaagtt 360

ggcgcatacg acgctaatag ttgaggaaac agtcattgaa ggcagagcta agcgggaagt 420

gaatgtaag ccgtggagag ggcgggcgaa ctaagaagc cttcgttttc ctccggccac 480

cgcgctgca tctttgagaa agsggtattg ctggaa 517

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> ヒト I I 型 5 α -レダクターゼの転写開始点付近の配列を参考にして合成
 <400> 5
 ccaccgcgcgc lgcaccccttg agaaaagggt attgc 35
 <210> 6
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> ヒト I I 型 5 α -レダクターゼの転写開始点付近の配列を参考にして合成
 <400> 6
 ttccgcgcgc gcgcgtgtt cctcgcgcgt gccgc 35
 <210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> ヒト SRY の cDNA 塩基配列 (翻訳開始点付近) を参考にして合成
 <400> 7
 ggaattctat gcaatcatat gcttctgcta 30
 <210> 8
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> ヒト SRY の cDNA 塩基配列 (ストップコドン付近) を参考にして合成
 <400> 8
 agaattcgc tttgtccagt ggcgttagcg 30

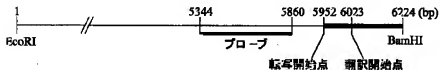
【図面の簡単な説明】

【図 1】 配列番号 1 に示すヒト I I 型 5 α -レダクターゼ遺伝子 5' 上流領域の構造を示す、プローブはヒトゲノムライブラリーのスクリーニングに用いたものであ

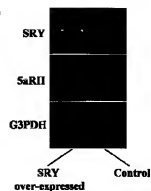
る。

【図 2】 実施例 5 に示す、培養ヒト毛乳頭細胞における SRY 過剰発現実験の結果である。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 DA02 DA06
EA04 FA02 GA11
4B063 QA01 QA18 QQ20 QR60 QR77
QR80 QX01
4B065 AA26X AA90X AA93Y AB01
AC14 CA46